

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

⑫ 公表特許公報(A)

平5-504253

⑬ 公表 平成5年(1993)7月8日

⑭ Int. Cl.³

識別記号

庁内整理番号

審査請求 未請求

C 12 N 15/35

ZNA

8931-4B
7236-4B

C 12 N 15/00
5/00

予備審査請求 有

部門(区分) 1(1)

A
B※

(全 12 頁)

⑮ 発明の名称 ワクチニアウイルスのポリペプチドのシグナル配列をコードするDNA

⑯ 特 願 平2-510018

⑰ 翻訳文提出日 平4(1992)1月10日

⑱ 出 願 平2(1990)7月10日

⑲ 国際出願 PCT/GB90/01062

⑳ 国際公開番号 WO91/00911

㉑ 国際公開日 平3(1991)1月24日

優先権主張 ㉒ 1989年7月11日 ㉓ イギリス(GB) ㉔ 8915870.3

㉕ 発 明 者 ガフニー、デイレナ・フラン イギリス国グラスゴウ、ジー14・9イーエフ、ノーズ・ロード 93
シス

㉖ 出 願 人 ブリテイツシュ・テクノロジー イギリス国ロンドン、エスイー1・6ビュー、ニューイントン・
ー・グループ・リミテッド コーズウェイ 101

㉗ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外6名

㉘ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), CA, CH(広域特許), DE(広域特許), DK(広域特許), ES(広域
特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広
域特許), US

最終頁に続く

請求の範囲

1. 以下のアミノ酸配列(配列1 D NO: 2):

Met Lys Glu Tyr Ile Val Leu Ala Cys Met

Cys Leu Ala Ala Ala Ala Met Pro Ala Ser

または前記のアミノ酸配列の保存的に修飾された変異体をコードするシグナル配
列DNA。

2. アミノ酸配列が(配列1 D NO: 2のC末端に続いて)さらにLeu、
Gln、場合によってはもう一つのGlnおよびさらに場合によりSerを含む
請求項1記載のDNA。

3. ボックスウイルスのゲノムの中への挿入に適したDNAカセットであり、
(5'から3'への順に)転写が可能なようにプロモーター配列に結合させた請
求項1または2に定義されたシグナル配列およびそれに続く外来遺伝子のフレー
ムを合わせた挿入のためのマルチクローニング部位、から成る前記のカセット。

4. シグナル配列とフレームの合った、マルチクローニング部位の下流の外来遺
伝子をさらに含む請求項3記載のDNAカセット。

5. ボックスウイルスのゲノムへの相等的組換えのために、下記カセットDNA
の両端に隣接するボックスウイルスの非不可欠部分の配列を含む請求項4記載
のカセットDNAを含む組換えベクター。

6. (1) 相等的組換えを可能にするボックスウイルスのゲノムの第一の配列;
(2) ボックスウイルスのゲノムの非不可欠部分(NER)の第一部分中の配
列;

(3) プロモーターDNA;

(4) 請求項1または2において定義された、転写を可能にするようにプロモ
ーターへ結合させたシグナル配列DNA;

(5) シグナル配列DNAとフレームを合わせた外来DNA;

(6) 前記のNERの第二部分中の配列;および

(7) 相等的組換えを可能にするボックスウイルスのゲノムの第二の配列;

からなる請求項5記載の組換えベクター。

7. ボックスウイルスと適合性の転写終結シグナルを外来DNA(5)および2

番目のNER部分(6)の間に含む請求項6記載の組換えベクター。

8. ボックスウイルスおよび請求項5、6または7記載の組換えベクターで感染
させた動物細胞。

9. 請求項8において請求した動物細胞により生産される外来タンパク質。

明 細 書

ワクチニアウィルスのポリペプチドのシグナル配列をコードするDNA

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は組み換えDNAの分野におけるものであり、ワクチニアウィルスの系統によって発現されるポリペプチドの分泌シグナル配列をコードするDNAに関連する。

2. 先行技術の説明

最近ワクチニアウィルスは哺乳類の細胞中へ外来遺伝子を導入するためのベクターとして使われている。ウィルスは哺乳類の宿主中で完全ではないまでも少なくとも限定された複製が可能であるように、外来遺伝子がウィルスの不可欠な機能を妨げないようなウィルスのゲノム中の「非本質的な部分」の中へ導入される。外来遺伝子の転写はワクチニアウィルスのプロモーターを要求し、そのプロモーターはゲノム中のどこか他の所から関連したDNAを切り取ることによって得られ、非本質的な部分の中の外来遺伝子の上流へ一緒に挿入される。

最も広く使われるワクチニアウィルス(VV)のプロモーターは「7.5 K」プロモーター(P 7.5 K)である。それは相対分子量約7.5キロダルトンのタンパク質をコードする遺伝子(7.5 K遺伝子)の転写を促進する。その遺伝子とプロモーターの部分配列はベンカテサンら(Venkatesan et al.), Cell 25, 805-813 (1981)によって部分的に決定された。

VV組み換え体の発現を改良することによりかなりの興味をもたれている。

例えば狂犬病ウィルスのワクチンのためのベクターとしての利用をもたらしたVVについての主要な研究は、ほとんど専らウエスタン リザーブ(Western Reserve)(WR)系統を用いて行なわれた。

10年以上前に、エバンス(Evans)系統を用いた研究でM. A. マッククラエ(M. A. McCrae)およびT. H. ペニングトン(T. H. Pennington), Journal of Virology 28, 828-834 (1978)には、感染後2から25日間後に細胞培養地中に大量に分泌されてそして分泌が続けられる相対分子量約35 KDのVVポリペプチドが記

述されている。しかし本発明者らの1人はエバンス(Evans)系統は十分に増殖しないことを見出した。そのポリペプチドによく用いられるWR系統には決して確認されていない。(WR系統を用いた研究で、G. J. コトワルおよびB. モス(G. J. Kotwal およびB. Moss), Nature 335, 176-178 (1988)には35 KDのポリペプチドの複製およびそれをコードする遺伝子のDNA配列が報告されているが、しかし彼らはマッククラエおよびペニングトン(McCrae and Pennington)が報告したものと実質に異なる35 KDのポリペプチドを記述している)。

発明の概要

本発明者らの研究は、35 KDポリペプチドがリストー(Lister)系統から分泌されて、この系統によく増殖するという発見、およびVVのリストー(Lister)系統は35 KDポリペプチドのための強力なプロモーターを含んでいるであろうという期待に基づいていた。VV組み換え体の中で異種の遺伝子の発現を増強するために、すなわち7.5 Kプロモーターに改良を加えるために、そのようなプロモーターは異種の遺伝子へ連結するために有用であろう。

しかし「35 K」遺伝子のクローニングとシーケンシングに基づいて、そのプロモーターの配列はWR系統の7.5 Kプロモーターのそれとほぼ同一であることが見いだされた。

しかしリストー(Lister)系統の35 K遺伝子はシグナル配列を含むことが見いだされた。シグナル配列にポリペプチドが感染された細胞の細胞膜を通過して培養地中へ入ることを可能にするものである。分泌の間にシグナル配列は切断されて、培養地中での成熟したタンパク質の生産という結果になる。この例では推定のシグナル配列は35 K遺伝子のシーケンシングおよびその配列を7.5 K遺伝子のそれと比較することによって初めに発見された。

この遺伝子のオープンリーディングフレームの最初の12のコドンは2つのウィルスで同じであるが、しかしその後はそれらに相違がある。35 K遺伝子の推定のシグナル配列は35 K遺伝子のオープンリーディングフレームの最初の17のコドンから成る。このオープンリーディングフレーム(ORF)の最初の20のコドンを下に示した:

ATG AAA CAA TAT ATC CTC GCA TGC ATG
Met Lys Gln Tyr Ile Val Leu Ala Cys Met
TGC CTC GCG GCA GCT GCT ATG CCT GCC AGT
Cys Leu Ala Ala Ala Ala Met Pro Ala Ser

(下線が省略されて番号がつけられていることだけが異なる配列ID NO: 1も見よ)。アンダーラインの付いた部分はWR系統の対応するDNAには存在しない塩基を表す。35 K遺伝子(35 KDタンパク質)がそこから翻訳される遺伝子を示すためにここで用いられる用語は、それがこれらの付加的な塩基を含むという点のみならず、付加的な配列のすぐ下流でフレームシフトが起きているという点でも7.5 K遺伝子と異なってコードしている。成熟したタンパク質の相対分子量が35 KDであるとの本明細書中の言及は便宜的な表現であり、この分子量が必ずしも正確であることを示すこととして用いてはいない。正確な推定分子量は後に示すアミノ酸配列から計算できる。

本発明は、カセットの製造での使用に、究極的には病原体ウィルスのゲノムの中への挿入に適したDNA分子、すなわち次のアミノ酸配列(配列ID NO: 2)をコードするDNA分子を提供する:

Met Lys Gln Tyr Ile Val Leu Ala Cys Met Cys Leu Ala Ala Ala
Ala Met Pro Ala Ser.

この配列は4つの付加的なアミノ酸の1つ、2つ、3つ、すなわちLeu、おそらくGly、おそらくもう1つのGlnおよびその後のSerをさらに含んでもよく(配列ID NO: 2のC末端から読んで含む)、本明細書中で「シグナル配列DNA」と呼ばれる。最初の17のコドンのみが35 KDタンパク質の分泌に要求されるらしいが、それにもかかわらず、成熟した35 KDタンパク質のアミノ酸をもコードする少なくとも3つの他のコドンは組換えベクター中でシグナル配列の使用に不可欠と考えられるので、「シグナル配列」という用語が用いられる。

アミノ酸の適当な置換によって、特にIleより前方の疎水性の範囲内で疎水性のアミノ酸への置換(Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Cys, Met, Phe, Tyr, Trp, Pro, Hisおよび時にはLys)によ

てシグナル配列DNAを変換することができる。そのような置換の許容できる程度は実験によって決定することができる。

好ましくはカセットはプロモーター、例えば7.5 Kプロモーターまたは35 K遺伝子の前にあるプロモーターのような望ましくは強力なプロモーター、を含む。外来遺伝子を容易に挿入できるように、カセットはシグナル配列の下流にマルチクローニング部位も含むことが好ましい。

哺乳類の細胞中へ導入される外来遺伝子は、原則として細胞へ感染させるときに用いる予定のボックスウィルスに関して外来の任意のものであってよい。したがって、カセットはシグナル配列DNAとフレームの合った外来遺伝子も含んでおり、便利である。

したがって好ましいカセットは転写が起るように互いに連結した次の因子から成る: - [(VV 7.5 Kのような)プロモーター] - [(「シグナル配列DNA」)] - [隨意であるが例えば配列ID NO: 3のような35 K遺伝子からさらに下流の配列、しかし配列ID NO: 3の最初の4つのアミノ酸をコードするDNAはシグナル配列DNAの一部であるかもしれない、次にここでは繰り返されたいであろうということを心に留めておくべきである] - [外来遺伝子または外来遺伝子の挿入のためのマルチクローニング部位] - [ウィルスの転写終結シグナル]。

カセットDNAをその両端に隣接したボックスウィルスの配列(感染するボックスウィルス由来)と共にもつバクテリアのまたはイーストのプラスミドのようなベクターを本発明は含む。本明細書中ではこれは「組換えベクター」と呼ばれ、最終的には相同的組換えの過程に利用するためのベクターを意味する。相同的組換えにおいて、組換えベクター中の隣接したボックスウィルスの配列は、感染するボックスウィルスの「親」系統の中に対応する配列と置き換わり、それによってカセットDNAはそのボックスウィルス中へ挿入されるようになる。

外来遺伝子の挿入のためのマルチクローニング部位をもち、3つの可能なオープンリーディングフレームのどれにでもシグナル配列とフレームを合わせてそれ

を挿入できるこの型の3つの別個のプラスミドが提供されることが理想である。さらに本発明は、相同的組換えから得られ、そのためにカセットDNAを含む組換えボックスウィルス、その組換えボックスウィルスによって感染された動物

細胞、試験管内での培養によって組換え体に感染された細胞から直接的にまたは間接的に得られる外来タンパク質、および出願の特許法が許す範囲で組換えウイルスを実験動物へ投与することから成るワクチン接種方法を含む。

図面の簡単な説明

図1はワクチニアウイルス(リスター(Lister)系統)のゲノムの一部の制限マップであり、35 K遺伝子の位置を示す；

図2は本発明の組換えベクターの調製に使用するための好ましいカセットの構造を模式的に示したプラスミドの説明図である；

図3(=3a+3b)は、シグナル配列を含むカセットDNAを含む本発明の組換えベクターの構造を、比較の目的のために作られた他の組換えベクター(そしてこれらはワクチニアウイルスの35 Kまたは7.5 K遺伝子中への相等的組換えに用いることができる)とともに示したプラスミドの誘導体形成を直線状態で説明する工程図である；および

図4(=4a+4b)は本発明の組換えベクターおよびワクチニアウイルスのTK遺伝子中への相等的組換えに用いることができる、比較のための組換えベクターの構造を示したプラスミドの誘導体形成を直線状態で説明する別の工程図である。

好ましい態様の説明

本発明は一般的にボックスウイルスのベクターに関して興味がある。ボックスウイルス族はVV7.5 Kプロモーターを鶏痘、ヤギ痘、牛痘、および鳩痘中で用いるのに十分なほどの類似性がある。以下において本発明をVVに基づいて説明するが、プロモーターおよびシグナル配列の組合せは、7.5 KプロモーターがそのゲノムのDNAの転写に機能する他の任意のボックスウイルス中において、遺伝子の発現および産物の分泌を促進するために有用であると認識されるだろう。

本発明のシグナル配列は35 KプロモーターDNAまたはその前に位置する7.5 Kの類似物に関連して主に用いられる。コ克蘭(Cochran)ら、J. Virol. 54, 30-37 (1985)によれば、VVのDNAのATC開始コドンのすぐ上流の137 bpは、WR系統における7.5 Kプロモーターの初期および後期促進機能の両方を含むことがわかる。これらの137 bpの中で、

35 K(または7.5 K)プロモーターは絶対的の要件ではなく、任意のボックスウイルスのプロモーターの後にシグナル配列を挿入することができる。プロモーターが同じウイルスに由来するという点さえ絶対的の要件ではない。本発明に例えばプロモーターおよびシグナル配列DNAを含むカセットを作成することによる、またはシグナル配列DNAを別に導入することによる挿入の任意の方法を含む。実際に位置特異的突然変異を現存するDNAを要するために使うことができるだろう。

現在最良と考えられるのは、カセットDNAが割り込んだまたはカセットを含むボックスウイルスのゲノムの非不可欠部分から成る構築物、即ちプロモーター、シグナル配列、任意であるが35 Kシグナル配列のすぐ下流の成るDNA、外来遺伝子の配列を導入するためのマルチクロニング部位、および任意であるがウイルスの転写終結因子、をこの順で含む構築物を作成することであると考えられている。例を挙げるために図2を参照すると、プラスミド「p1」(任意の名称)は非不可欠部分の左側の配列、プロモーター、シグナル配列、W、X、YおよびZ(4つを示したが、「マルチ」の用語は2つ以上を意味する)の制限サイトをもちマルチクロニング部位および非不可欠部分の右側の配列を含む。(上で列挙した任意の付加的な成分は例を明快にするために省略した)。Xはプラスミド「p2」からの配列X-Xをクロニングサイトに挿入することを可能にする制限サイトであり、その結果組換えプラスミド「p3」が得られる。

そのようなプラスミドの構築物を用いて、組換えはボックスウイルスのゲノムの非不可欠部分(non-essential region)(NER)中で起こるだろうと期待できる。したがってNERは外来遺伝子の発現に用いる予定のものと同じボックスウイルスのもの、そしてもし可能ならば同じ系統のものであることが好ましい。さらにあるNERはいくつかのボックスウイルス中で実質的に同相性があるかもしれず、その場合にはNERは同一のウイルスのものである必要はない。組換えベクターのNERの感染させるボックスウイルス(すなわち組換えはその中での起るウイルス)のNERとの正確な同相性は必ずしも必要ではない。適当なNERの例はワクチニアウイルスにとってはTK遺伝子または35 K遺伝子(これは不可欠ではなく、そして末端の逆転した繰返し部分の中に

最後の18 bp(後ろに数えて)はコ克蘭(Cochran)らの論文に記述された構築物中には存在せず、そのためにおそらく不可欠ではない。リスター(Lister)系統の35 Kプロモーターにはほぼ同一であり、mRNAの推定の転写開始点の86 bp上流までの部分の中にわずか2つの塩基の置換があるのみである。137-18=115 bpの長さもしも望むならば短くすることができ、例えばデレション地図作成、オリゴヌクレオチドの合成、位置特異的突然変異などの該当分野でよく知られた実験によって決めることにより、プロモーター中で様々なデレションまたは変化をすることができるであろう。そのような様々な配列のすべては、ここで用いられる「7.5 Kプロモーター」(P7.5 K)または「35 Kプロモーター」(P35 K)という用語の範囲内にある。

しかし、シグナル配列はボックスウイルス中で他のボックスウイルスのプロモーターとともに、または、例えば単純疱疹ウイルス中のような他のウイルス中でそれぞれのプロモーターとともに、用いることができる可能性がある。

シグナル配列はプロモーターの強さにかかわらず分泌を確実にするであろうから、プロモーターは強力なものである必要はない。

上に示した、分泌後に切断される35 Kタンパク質の前駆体であるポリペプチドの部分は、メチオニン(Met)残基を末端に有し、その直後のプロリン(Pro)残基が成熟した35 Kタンパク質のN末端のアミノ酸になる。本発明では前駆体ポリペプチドのシグナル配列をコードする任意の17コドンのDNAは、成熟した35 Kタンパク質のN末端の少なくとも3つのアミノ酸、好ましくはN末端の少なくとも5つのアミノ酸と結合し、望まれる外来遺伝子(ボックスウイルスに関して外来であるもの)がその後続く。これによって外来遺伝子が宿主細胞によって分泌されることが確率的に保証されるだろう。したがって、分泌されるタンパク質は、N末端で成熟した35 Kタンパク質のN末端の部分のアミノ酸と融合した外来タンパク質であろう。成熟した35 Kタンパク質のN末端のアミノ酸の望ましい数は、実験で決めなければならない問題であるが、しかし融合ポリペプチドの発現は、外来遺伝子の融合のためのオープンリーディングフレーム(シグナル配列も含めて)の2番目または4番目のコドンの位置を用いたときに得られた。

ある)であり、そして鶏痘ウイルス(FPV)にとっては、NRDCのイギリス特許公開第2220941A(または対応のPCT国際公開第W089/12684)に記述されているように逆転した末端の繰返し(1TR)中の非不可欠部分であるが、しかしNERのゲノム中での位置は重要ではない。外来遺伝子が1TR中にある場合は、2コピーの外来遺伝子がボックスウイルスのゲノムに入る。

理論的には少なくとも相等的組換えにはNERは必要ではなく、プロモーター、シグナル配列および外来DNAが非不可欠部分の中へ挿入されかぎり相等的組換えは不可欠な遺伝子の中で起こることができる。したがってNERそれ自身はその中に不可欠な遺伝子が存在する部分に隣接することができる。カセットはその両端に少なくとも1000 bpの隣接した配列、すなわちNER配列と任意のさらに隣接した配列、を含むことが好ましい。

したがって好ましい構築物(組換えベクター挿入物)次の物を含むのが便利である：

- (1) 相等的組換えが可能なボックスウイルスゲノムの第一の配列；
- (2) ボックスウイルスゲノムの非不可欠部分(NER)の最初の部分の中にある配列；
- (3) プロモーターDNA；
- (4) 転写ができるようにプロモーターに結合させた、すなわち転写が起こるような方法で結合させた、本発明のシグナル配列DNA；
- (5) シグナル配列DNAとフレームを合わせた外来DNA；
(好ましくは更に5Aとして；ボックスウイルスと適合する転写終結シグナル)；
- (6) 前記のNERの2番目の部分の中にある配列；および
- (7) 相等的組換えが可能なボックスウイルスゲノムの第二の配列。

必要な組換えベクターを生産するために、そのような構築物をバクテリアのプラスミドベクターのような適当なベクターの中へクロニングする。

配列(1)および(2)は必ずしも別個のものではなく、(6)および(7)もまたそうである。終結シグナルは成熟mRNAの生産には重要かもしれない。

組換え体 VV または他のボックスウィルスを生産する組換えは、VV 組換え技術において知られている任意の方法によって起こすことができ、ボックスウィルスの適当な系統を動物細胞中へ試験管内で導入すること、およびまた本発明の組換えベクターをこれらの細胞へ導入することを含む。VV が感染できる任意の動物細胞例えばラット、ウサギ、トリまたはヒトでさえも使用可能であろう。

本発明が企図する主要な利用は、タンパク質として発現させるべき外来 DNA の動物細胞への導入のためのベクターとして、ワクチニアウィルスまたは別のウィルスを用いて、試験管内でタンパク質を合成することにある。しかし、例えば鶏痘ウィルスで家禽にワクチン処理するように、組換えボックスウィルスでワクチン処理すべき動物体内での外来産物の生産のためにシグナル配列を組み込むことも有益である可能性がある。

このようにして生産された外来タンパク質は、外来タンパク質の配列に融合した成熟した 35 KD VV タンパク質のアミノ酸を除去するための、そして/または糖鎖を除去するための酵素による処理をおそらく必要とするであろう。任意の伝統的なそのような処理を用いることができる。本発明は、直接的であろうと間接的であろうと動物細胞から得られた外来タンパク質を含む。

次の実施例により本発明を説明する。

実施例 1

35 KD ポリペプチドをコードする遺伝子の地図作成のための方法

35 KD ポリペプチドをコードする遺伝子の地図を作成するために用いられる戦略は数段階を含んだ：

- (i) 初めに 35 KD ポリペプチドを精製して、感染細胞の mRNA から試験管内で合成したポリペプチドの中から 35 K 遺伝子の産物を認識できる抗血清を作成するために用いた。
- (ii) ワクチニアウィルスのゲノムの全体に由来するいくつかの特定の DNA 断片を、35 KD タンパク質の試験管内での翻訳を阻害する能力についてテストした。
- (iii) 翻訳を阻止した小さい (2.2 kb) DNA を同定し、その DNA 配列を決定した。これによって 35 K 遺伝子の位置を正確に決定することおよびコードし

よび S_aI 断片を同定することができた。この断片は逆転した末端の繰り返しであり、完全なコピーに存在するので、実際にウィルスのゲノム当たり 35 K 遺伝子が 2 コピー存在する。

図 1 にはワクチニアウィルスのゲノム上での 35 K 遺伝子の位置を示す。ボックス状に囲んだ部分は逆転した末端の繰り返し配列を示し、そして末端の Hind III (H) 断片 B および C の位置を示されている。拡大した部分は 35 K 遺伝子 (矢印をつけた) の翻訳を阻害した 2 コピーの 2.2 kb の BamHI (Ba) および S_aI (S) 断片を示す。「S_s」は S_sI サイトを示す。

35 K 遺伝子のスクレオチド配列

完全な 2.2 kb の BamHI および S_aI 断片、および S_aI サイトの下流約 300 bp の DNA 配列をジデオキシチエンターミネーション法を用いて決定し、下に示す。(配列 I D NO: 4)。

ているポリペプチドの配列を推定することが可能になった。

抗血清の生産

ワクチニアウィルスのリストア (Lister) 系統は広く入手可能である。ウサギ腎 (RK) 細胞にそのウィルスを感染させて、ウィルスを加えてから 25 時間後に血清を含まないリン酸塩緩衝液として含む塩水 (PBS) で十分に洗浄した。次の 3-4 時間の間に PBS 中へ分泌されたタンパク質を集めて、ワットマン (Whatman) DE 52 のカラムを用いたジェチルアミノエチルセルロース (DEAE cellulose) イオン交換クロマトグラフィーに運した。他の混入したタンパク質を少量含むだけの 35 KD タンパク質の調製品が得られた。

DEAE セルロースカラムで精製した調製品を用いてウサギを免疫し、それによって得られた抗血清は分泌された 35 KD タンパク質を沈殿させることができた。

感染細胞の mRNA のハイブリッドアレステッドトランスレーション

リストア (Lister) 系統のウィルスで感染させた細胞から得た mRNA を、ウサギ網状赤血球の溶解物を用いて試験管内で翻訳させて、ポリペプチドを抗血清を用いて沈殿させた。2 つの試験管内の産物は効率良く免疫沈降した。D. W. クリーブランド (D. W. Cleveland) ら、J. Biol. Chem. **252**, 1102-1106 (1977) に記述されたクリーブランド (Cleveland) の消化法を用いて、これらの 1 つ (IPA と名付けられた) を、成熟した分泌 35 KD タンパク質の試験管内での前駆体であると同定することができた。

ワクチニアウィルスのゲノムの様々な部分を代表する DNA の断片にハイブリダイズした mRNA を用いて、次に試験管内の翻訳と免疫沈降反応を行なった。B. M. パターソン (B. M. Paterson) ら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA **74**, 4370-4374 (1977) の手順を用いた最初の実験では、末端の Hind III 断片 B および C (図 1) が 35 K 前駆体の翻訳を阻害した。クローニングしたサブ断片をテストすることによって、効率よく翻訳を阻害し、それゆえ 35 K 遺伝子の配列を含む 2.2 kb の BamHI お

```

GGATCCGACC CTAATTGGCG CGACGAGGAT GAACCTCACTT CTCTTCATTA CTACTGTAAA 60
BamHI
CACATATCCA CGTTCTACGA AAGCAATTAT TACAAGTCAA GTCACTACTAA GATGCGAGCC 120
GAGAAGCGAT TCATCTACGC GATAATAGAT CATGGAGCAA ACATTAACGC GGTTCACAC 180
TTACCTTCAA CAGTATACCA AACATAGTCC TCGTGTGGTG TATGCTCTTT TATCTCGAGG 240
ATACGTAATA ATCTTGATTG TACACCATCA TGGAACGATT GTGCAACAGG TCATATTCTC 300
ATAATGTTAC TCAATTGGCA CGAACAAAAA GAAGAAGGAC AACATCTACT TTATCTATTTC 360
ATAAACATA ATCAAGGATA CACTCTCAAT ATACTACGGT ATCTACTAGA TAGGTTCGAC 420
ATTGAGAAAG ACGAATACTA TAATACCGCC TTTCAAAAAT GTACAACAA TGTGTGCTCA 480
TACATCGGAT ACGACATCAA CTTTCCGACT AAAGACGSTA TTCGACTGG TGTGTGAAAA 540
CAGAACATC ATATACAAGG CGGATGTTGT GAATGACATC ATCCACCACA GACTGAAAGT 600
ATCTCTACCT ATGATTAAT CGTTGTTCTA CAAGATGTCT CTCCTACGA CGATTACTAC 660
GTAAAAAAGA TACTAGCCTA CTGCTATTA AGGACGAGT CATTGCGGGA ACTACATAGT 720
AAATTCTGTT TAAACGAGGA CTATAAAGT GTATTTATGA AAAATATATC ATTCGATAAG 780
ATAGATTCCA TCATCGTGAC ATAAGTCGCC TTAAGAGAT TCGAATCTCC GACACCGACC 840
TGTATACGGT ATCAGAGCTA TCTTAAAGCC ATACATTCAG ACAGACACAT TTCAATTCCT 900
ATGTACGAGC ATCTCAAAAC CGTACCCAGA AATACCTTTA ACTATATCGG TGTGGAAATT 960
ClaI
AATCTGTATC CCGTCAACGA CACATCGTGT ACTCGGACGA CCACTACCGG TCTCAGCGAA 1020
TCCATCTCAA CGTCGGAACT AACTATTACT ATGAATCAT AAGACTGTAA TCCCGTCTTT 1080
CGTGATGGAT ACTTCTCTGT CCTTAATAAG GTAGCAACTT CAGGTTCTTT TACGAGGAA 1140
AGGTGTGCAC TCTGAATTC GAGATTAAT GCAATAACAA AGATTCTTCC TCCAAACAGT 1200
TAACGAAAGC AAAGAATGAT ACTATCATGC CGCATTCGGA GACAGTAAT CTAGTGGCGG 1260
ACATCTATAT ACTATATAGT AATACCAATA CTCAGACTA CGAACTGAT ACAATCTCTT 1320
ATCATGTGGG TAATGTTCTC GATGTCGATA GCCATATGCC CGTAGTTGCG GATATACATA 1380
AACTGATCAC TAATTCCAAA CCGACCGACT TTTTATAGTA AGTTTTCAC CCATAMAATA 1440

```

TAAATACAT AATTAATTTT TCGTAAAGT AGAAATATA TCTAATTTT TTGCACGGTA		1500
5' ATG (GATC) ATG	AGGAAGTAGA ATCATAAAGA ACAGTACTCA ATCAATAGCA ATT ATG AAA CAA TAT	1555
	Met Lys Gln Tyr -15	
ATC GTC CTG GCA TGC ATG TGC CTG ATG GGA GGT GGT ATG GGT GCC AGT	1603	
Ile Val Leu Ala Cys Met Cys Leu Ala Ala Ala Ala Met Pro Ala Ser		
-10	-5	1
CTT CAG CAA TCA TCC TCA TCC TCC TCC TCG TGT ACG GAA GAA GAA AAC	1651	
Leu Gln Gln Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Thr Glu Glu Glu Asn		
5	10	15
AAA CAT CAT ATG GGA ATC GAT GTT ATT ATC AAA GTC ACA AAG CAA GAC-	1699	
20 His His His Met Gly Ile Asp Val Ile Ile Lys Val Thr Lys Gln Asp 35		
CAA ACA CCG ACC AAT GAT AAG ATT TGC CAA TCC GTA ACG GAA ATT ACA	1747	
Gln Thr Pro Thr Asn Asp Lys Ile Cys Gln Ser Val Thr Glu Ile Thr 50		
40	45	50
GAG TCC GAG TCA GAT CCA GAT CCC GAG GTG GAA TCA GAA GAT GAT TCC	1795	
Glu Ser Glu Ser Asp Pro Asp Pro Glu Val Glu Ser Glu Asp Ser 65		
55	60	65
ACA TCA GTC GAG GAT GTA GAT CCT CCT ACC ACT TAT TAC TCC ATC ATC	1843	
Thr Ser Val Glu Asp Val Asp Pro Pro Thr Thr Tyr Tyr Ser Ile Ile 80		
70	75	80
GGT GGA GGT CTG AGA ATG AAC TTT GGA TTC ACC AAA TGT CCT CAG ATT	1891	
Gly Gly Gly Leu Arg Met Asn Phe Gly Phe Thr Lys Cys Thr Gln Ile 95		
85	90	95
AAA TCC ATC TCA GAA TCC GCT GAT GGA AAC ACA GTG AAT GGT AGA TTG	1939	
Lys Ser Ile Ser Glu Ser Ile Asp Ala Asn Thr Val Asn Ala Arg Thr 115		
100	105	110
TCC AGC GTG TCC CCA GGA CAA GGT AAG GAC TCT CCC GCG ATC ACT CGT	1987	
Thr Ser Val Ser Pro Gly Gln Gly Lys Asp Ser Pro Ala Ile Thr Arg 130		
120	125	130
GAA GAA GCT CTT GCT ATG. ATC AAA GAC TGT GAG GTG TCT ATC GAC ATC	2035	
Glu Glu Ala Leu Ala Met Ile Lys Asp Cys Glu Val Ser Ile Asp Ile 145		
135	140	145
AGA TGT ACC GAA GAA GAG AAA GAC AGC GAC ATC AAG ACC CAT CCA GTA	2083	
Arg Cys Ser Glu Glu Glu Lys Asp Ser Asp Ile Lys Thr His Pro Val 160		
150	155	160

注：系統WRについて発表されている配列は残基1267-1605および

2405-2570に対応する。上記引用文中のコクラン (Cochran) らによって、WR系統のVV7.5 Kプロモーターを含むと同定された開始コドンの137 bp 上流の上の配列の中に対応物は1407から1543であろう (1544番目の開始コドンのすぐ前に位置する)。

もっとも長いオープンリーディングフレームは235のアミノ酸であり、そのC末端のSa11サイトを越えてのびている。推定されたポリペプチドのN末端はシグナル配列として機能する17アミノ酸の疎水的な部分をコードする。これを越えると、推定されたアミノ酸配列は(配列ID NO:5):Pro
Ala Ser Leu Gln Gluである。

この配列は、アバディーン大学 (The University of Aberdeen) の J. E. フォザーギル (J. E. Fothergill) および B. デンバー (B. Dunbar) が本発明者らのために非公式に取得した DE52 カラムで精製した成熟した 35 K D タンパク質の N 末端の限定されたアミノ酸配列 (未知-A1a-未知-Leu-Gln-Gln) に対応し、これによって配列を決定した遺伝子が分泌された 35 K D タンパク質をコードすると確信した。35 K D 遺伝子の残りの部分 (Sal I サイトの下流) は、重複するクローニングした DNA 断片をシーケンシングすることによって決定し、それにより完全な遺伝子はさらに 23 のアミノ酸をコードしていた。

2.2 kbのBamHIおよびSalI断片の配列を、SalIサイトの下流の約300残基とともに示す。3.5 Kのオープンリーディングフレームがコードするアミノ酸を示す。系統WRのDNAに欠けている19残基には下線を引いてあり(1580-1598を含む)、そして星印をつけたプロリンは成熟した分泌される3.5 KDタンパク質(すなわちシグナル配列の切断後の)のN末端の位置(アミノ酸番号1)を示す。系統WRの7.5 K mRNAの5'および3'末端の配列決定された位置も示す(ベンカテサン(Venkatesan)らの論文から引用)。下線を引いた制限酵素の認識部位はClaI、BamHIおよびSalIのためのものである(実験例2を見よ)。

案例 2

CTC GGG TCT AAC ATC TCT CAT AAG AAA GTG AGT TAC GAA GAT ATC ATC Leu Gly Ser Asn Ile Ser His Lys Lys Val Ser Tyr Glu Asp Ile Ile	2131
165 170	
GGT TCA ACC ATC GTC GAT ACA AAA TGT GTC AAG AAT CTA GAG TTT ACC Gly Ser Thr Ile Val Asp Thr Lys Cys Val Lys Asn Leu Glu Phe Ser	2179
180 185	
GTT CGT ATC GGA GAC ATG TGC AAG GAA TCA TCT GAA CTT GAG GTC AAG Val Arg Ile Gly Asp Met Cys Lys Glu Ser Ser Glu Leu Glu Val Lys	2227
200 205	
SalI	
GAT GGA TTC AAG TAT <u>CTC GAC</u> GGA TCG GCA TCT GAA GGT GCA ACC GAT Asp Gly Phe Lys Tyr Val Asp Gly Ser Ala Ser Glu Gly Ala Thr Asp	2275
215 220	
ClaI	
GAT ACT TCA CTC <u>ATC GAT</u> TCA ACA CTC AAA GCG TGT GTC TGA Asp Thr Ser Leu Ile Asp Ser Thr Lys Leu Lys Ala Cys Val —	2320
230 235	
<u>ATCGTA</u> ACT CTATTCATCT GAAATTGGAT GAGTAGGGTT AATCGAACGA TTCAGGCACA <u>ClaI</u>	2380
240	
CCACGAATTA AAAAGTGTA CCGGACACTA TATTCGGGT TGCAAAACAA AAATGTTCTT	2440
AACACATTC ACAAAAAGTT ACCTCTCGGG ACTTCTCTT TTCTGTCTC AATAGTGTGA	2500
TACGATTATG ACA <u>TATTC</u> <u>TATTCATT</u> <u>CTATTTCT</u> TTCAGGGTAT CACAAAAATA	2560
mRNA 3' 末型	
TTAAAGCTCT TTCTGAT	2577

Note :

この実施例はプロモーターおよびシグナル配列のテストに関するものである。

3.5 K遺伝子の部分に由来するカセットを含む組換えベクターの構築と3.5 K遺伝子の中へ挿入するための外来遺伝子

図3は、プロモーター、シグナル配列(比較のための構築物の中では省略する)および外来遺伝子から成るカセットDNAの構築に用いるプラスミドを直線状態で示した地図である。図3に言及すると、末端のHind III断片をさらに消化したBamHI-SalIサブ断片を、広く入手できるプラスミドpUC19中でクローニングした。その結果得られるプラスミドは35KDタンパク質をコードする配列の大部分を含み、pG62と名付けた。35K遺伝子の残りの部分はプラスミドp48-15中の重複するXbaI断片に位置する。pG620はこれらの2つのプラスミドから構築されて、完全な35K遺伝子を含んだBamHIからXbaIまでの断片を含む。

35 KDa前駆型ポリペプチドのN末端の最初の42のアミノ酸を除くすべてのコード領域を含むC1aI断片から次のようにデレクションミュータントを作成した。pG62をHindIIIで消化し、そしてC1aIで部分消化した。pUC19およびBamHIから始まり2番目のC1aIサイトまでのワクチニアのDNA配列を含むDNA断片をアガロースゲルからエレクトロエレーションによって単離し、プラスミドp48-15のC1aIおよびHindIII断片ヘライゲーションして、pD35を作成した。

pD35の35Kプロモーターから下流のC1a1サイト中へBglⅡリンカーを導入してpD35-Lを作成した。pD35-L中のワクチニアのDNA配列をEcoRIからSmaⅠまでの断片として同じ制限酵素で切断したpAT153中へサブクローニングした。その結果得られたプラスミドpD351は35K遺伝子の左のDNA配列〔35K(L)〕、35Kプロモーター(P35K)およびN末端の42のアミノ酸をコードする配列(17アミノ酸から成るシグナル配列を含む42アミノ酸から成る前駆体ポリペプチド)、その後継唯一のBglⅡサイトおよび35K遺伝子の右のDNA配列〔35K(R)〕を含む。BamHI断片上のそれぞれlacZ遺伝子およびcatL遺伝子を別々にpD351のBglⅡサイトへクローニングして、プラスミドpD352およびpD351/

CATをそれぞれ作成した。これらの構築物は、35 K前駆体ポリペプチドのN末端の42アミノ酸をコードするDNAとフレームを合わせて結合させた上のマーカー遺伝子を含み、そして35 Kプロモーターを含む。

比較の目的のために、lacZおよびcat遺伝子を35 K遺伝子のATG翻訳開始コドンのすぐ下流へ導入するためのベクターを構築した。そのようなベクターにシグナル配列を欠いているが、しかし外来遺伝子に結合したプロモーターを含む。pD351をBamHIで消化して、末端をうめて平滑末端として、そしてSalIで部分消化した。BamHI/うめて作成した平滑末端から始まる35 K (R) 配列、pAT153およびATG開始コドンから18bp上流のSalIサイトで終わる35 K (L) 配列を含むDNA断片をアガロースゲルからエレクトロレーションによって単離して、リンカー (配列ID NO: 6) -AC TCAATCAA TAGCAATTAT GCATCCへライゲーションしてpD356を作成した。これによってBamHIサイトをATGコドンのすぐ下流に作ることが可能となり、pD351中の35 K遺伝子のN末端をコードする配列を欠失させることも可能となった。ATGコドンの上流の配列は変化なしに残された。新しく作成したBamHIサイトへ、lacZおよびcat遺伝子をコードするBamHI DNA断片を別々に挿入して、それぞれpD357およびpD358/CATを作成した。これらの構築物はマーカー遺伝子にフレームを合わせて結合させた35 K遺伝子の最初のATGコドンを含む。

2つのマーカー遺伝子の、35 K前駆体ポリペプチドの最初の22のN末端のアミノ酸をコードする (推定のシグナルペプチドを含む) DNAのみへのフレームの合った翻訳の融合が可能なるベクターを構築するために、35 K (R) 配列およびpAT153を含むpD356のEcoRIおよびBamHI断片を、35 K (L)、35 KプロモーターおよびSphIおよびBamHIの接着末端のあるオリゴヌクレオチドリンカーの存在下でSphIサイトの下流をコードする配列 (アミノ酸-10-5、BamHIサイトの前) を含む前駆体のポリペプチドをコードする配列 (最初の7アミノ酸) の一部を含むpG62のEcoRIおよびSphI断片へライゲーションして、pD358を作成した。lacZおよびcat断片を別々にpD358中の新しく作成したBamHIサイトへ挿入し、

35 Kプロモーター配列およびATG開始コドンを含む比較用のカセットベクターpD356の約170bpのBclIおよびBamHI断片を、pV321のTK遺伝子座の中のBamHIサイトへクローニングして、pV326を作成した。lacZおよびcat遺伝子をコードするBamHI DNA断片をpV326中のATG開始コドンのすぐ下流のBamHIサイトへ別々に挿入し、それぞれpV327およびpV328を作成した。これらのプラスミドは35 Kプロモーターを含むが、シグナル配列を欠いており、比較の目的のために作成した。

35 Kプロモーターおよび前駆体ポリペプチドのN末端から最初の22アミノ酸をコードする配列を含む比較のカセットベクターpD358の約230bpのBclIおよびBamHI断片をpV321のTK遺伝子座の中のBamHIサイトへクローニングしてpV329を作成した。BamHIのcat断片を次に、35 Kプロモーターおよび22アミノ酸のシグナル配列をコードする配列の下流のBamHIサイトへフレームを合わせて挿入し、pV331を作成した。

lacZ遺伝子を含む組換えワクチニアウィルスの構築および分析

リン酸カルシウムで沈殿させたプラスミドpD357およびpV327 (35 Kプロモーターに結合したlacZ遺伝子を含むがシグナル配列を含まず、それぞれ35 KおよびTK遺伝子座中に挿入されている) を、野性型ワクチニアウィルスの系統リスター (Lister) を感染させたCV-1細胞へトランスフェクションした。組換えウィルス (青いプラーク) を以前に報告された方法で単離した (マケット (Mackett) ら、J. Virol., 49, 857-864 (1984); チャクラバティ (Chakrabarti) ら、Mol. Cell. Biol., 5, 3403-3409 (1985))。

35 K遺伝子座またはTK遺伝子座 (それぞれV357およびV327) に35 Kプロモーターの制御下にあるlacZを含む組換えウィルスは、 β -ガラクトシダーゼ活性を効率良く発現した。期待されたように活性の大部分は細胞内に存在した。lacZ遺伝子は、V357ゲノムの両方の逆転した末端の隣接し中に挿入されていたことがサザンブロット解析から確認された。

V357に感染した細胞は、培地中にも細胞の抽出物中にも検出できるほどの35 KDタンパク質を発現していなかった。lacZの発現が35 KDタンパク

それぞれプラスミドpD359およびpD358/CATを作成した。

ワクチニアウィルスのTK遺伝子座へのカセットDNAの挿入のための組換えベクターの構築

図4の直線状態で示したプラスミドの地図に言及すると、35 Kプロモーターに結合させた、マーカー遺伝子のVVゲノムのTK (チミジン キナーゼの非不可欠遺伝子) 遺伝子座への挿入を可能にする組換えベクターを構築した。次の配列のリンカーを合成すること: AATTCGATCC

CCTAGGTTAA

およびこのリンカーをプラスミドpV32中のTK遺伝子内に位置するEcoRIサイトへ挿入することによってBamHIサイトを導入し、pV321を作成した (pV32はリスター (Lister) 系統のDNAのHindIIIのK断片を含むpAT153である; WR系統のゲノムの対応する断片はTK遺伝子を含む)。35 Kプロモーターおよび前駆体ポリペプチドのN末端の42アミノ酸 (42aa) をコードする配列から成るpD351の約270bpのBclIおよびBglII断片を、BamHIのcat断片とともに、pV321のTK遺伝子座の中の新たに作成したBamHIサイトへ挿入した。この新しい組換えベクターpV325は、ワクチニアのゲノムのTK遺伝子座中への挿入のために、35 Kプロモーターの制御下で35 K遺伝子から発現する、cat遺伝子のN末端の42アミノ酸への融合を可能にするフレームの合った結合を生じた。TK (L) およびTK (R) はTK遺伝子の左および右の部分を含むワクチニアのDNAの断片のことである。

上のpD351のBclIHIおよびBamHI断片は、11Kワクチニアプロモーター (P11K) とpSC8 (pSC8はワクチニアのTK配列が両側に隣接する11KのVV後期プロモーターの制御下のlacZを含む; S. チャクラバティ (S. Chakrabarti) ら、Mol. and cell. Biol., 5, 3403-3409 (1985)) のlacZ遺伝子との間のBamHIサイトへも挿入し、pSC8/351を構築した。このプラスミドは35 K前駆体ポリペプチドのN末端の42アミノ酸をコードするDNAへ融合したlacZ遺伝子を含み、35 Kプロモーターの制御下にある。

質の合成を途中で限定した可能性を排除するために、TK遺伝子座中に挿入された同じ35 Kプロモーター-lacZ融合体を含む組換えウィルスV327は35 KDタンパク質を発現して分泌する能力を保持していることを示した。これらの結果はV357が35 KDタンパク質を発現できないのは35 K遺伝子の欠失のためだということを示している。これらの結果は35 KDの分泌されたタンパク質が実施例1で同定されたオープンリーディングフレームにコードされていることを確認し、その存在が組織培養中のリスター (Lister) 系統のワクチニアウィルスの増殖には不可欠ではないことを示す。

cat遺伝子を含む組換えウィルスの構築

上に記述したように、プラスミドpV328、pV331、pV325およびpD351-CATを用いて、それぞれ組換えウィルスV328、V331、V325およびV351-CATを構築した。cat遺伝子をウィルスV328、V331およびV325のリスター (Lister) 系統のTK遺伝子座へ、そしてV351-CAT中の35 K遺伝子の両コピーへ挿入した。V328、V331、V325およびV351-CATは、cat遺伝子の5' 末端へフレームを合わせて結合させた前駆体ポリペプチドのそれぞれ0、22、42および42アミノ酸をコードする配列を含む。

組換えウィルスによるCATの分泌

上のcat組換えウィルスで感染後6時間のCV1細胞を用いて分泌された (SP) および細胞内の (CE) CATタンパク質およびCAT酵素活性を求めた。結果を表1に示す:

表1

組換えウィルスによるCATポリペプチドおよび酵素活性の分泌

Virus	ELISA Titer ng CAT	タンパク質/2×10 ⁸ 細胞	CAT 活性 アセチル化されたクロラムフェニコールのnmole /2 × 10 ⁸ 細胞	
			SP	CE
V328	0.138	65.50	1.335	205.150
V331	2.000	2.60	8.825	1.420
V325	2.930	1.85	0.975	0.343
V351-CAT	3.400	1.00	4.095	1.350

注：酵素免疫学的定量 (ELISA) および酵素活性のデータは別個の実験から得られる。測定は、感染から6時間後に収穫し、細胞外の培地 (SP) または細胞内の抽出物 (CE) について行なった。

対照のウィルスであるV328は他のウィルスよりもはるかに多くのCATタンパク質を生産したが、V331、V325およびV351-CATが感染した細胞からはそれよりもかなり多く分泌されたことが表1からわかる (ELISAの結果を見よ)。同様に別個の実験におけるCATの酵素活性の測定からは、検出できる活性の大部分は、V331、V325およびV351-CATが感染した細胞では分泌されるが、V328が感染した細胞では細胞内に残ることがわかった。35KD前駆体ポリペプチドのN末端から22および42のアミノ酸を含む断片は機能しうるシグナル配列を含み、標準的な多くの細胞内のCATタンパク質を効率よく分泌にむけることが可能であることをこれらの結果は示している。

CATの分泌へのチュニカマイシンの効果

上に記述した型の実験における再現性のある知見は、組換えウィルスV331、V325およびV351-CATの生産するCATタンパク質はV328の生産するものよりも低い比活性 (すなわちCATタンパク質ng当たりの) を示すということだった。これはたぶん、糖鎖の付加が起こることが知られている分泌のための経路をCATタンパク質が通るようにさせるシグナル配列の結果として、前者のタンパク質には糖鎖の付加が起こるためであろうと考えられた。さらにCATタンパク質は34-36の位置にNに結合して糖鎖の付加が起こる可能性

のある部位Asn-Gln-Thrを含むことに注目した。この仮説をテストするために、タンパク質のNに結合する糖鎖の付加を阻害するチュニカマイシンを用いた。チュニカマイシンの存在下または非存在下でCAT組換えウィルスを感染させてから18時間後のCV-1細胞の培地 (SP) および細胞内の抽出物 (CE) においてCAT活性を測定した。

結果を表2に示す：

表2

CAT分泌へのチュニカマイシンの効果

Virus	CAT 活性 アセチル化されたクロラムフェニコールのnmole / 2 × 10 ⁸ 細胞		CAT 活性	
	SP	CE	SP	CE
	+T	-T	+T	-T
V328	1.16	3.01	2328.30	2573.60
V331	155.30	51.78	171.80	16.00
V325	338.40	12.50	199.20	7.40

注：チュニカマイシンの存在下 (+T) または非存在下 (-T) で細胞に感染させて、培地 (SP) および細胞内の抽出物 (CE) についてCAT活性を求めた。

表2の結果は、チュニカマイシンはV331およびV325によって生産されるCAT活性の水増しを向上させるが、V328によるものについては向上させないことを示す。チュニカマイシンは合成されるCATタンパク質の量を少し減少させることをタンパク質ゲルが示した。したがってV331およびV325によって生産される融合タンパク質の比活性はチュニカマイシンの存在下で実質的に増加する。これは、少なくとも部分的には糖鎖の付加の阻害のために、これらのウィルスによって生産されるCATタンパク質の活性が低下することと一致する。V331およびV325が感染した細胞中でチュニカマイシンの存在下で検出される細胞内の活性が増加することは、細胞内の酵素活性は分泌の経路中で一過性であることを示す。

cat遺伝子の、オリゴヌクレオチドが誘発する突然変異

アミノ酸の位置34-36のNに結合する糖鎖付加の可能な一つの位置Asn

-Gln-Thrを除去するために、cat遺伝子に特異的に突然変異を起こさせた。アミノ酸Asn-34およびThr-36を以下のようにそれぞれGlnおよびValで置換した。cat遺伝子を含むBamHI断片をベクターpTZ19U (ファルマシア (Pharmacia)) 中へサブクローニングして、このプラスミドpTZ19U-CATの作る一本鎖DNAの鋳型を大腸菌系統TG1中で、ヘルパーファージとしてファージM13KO7を用いて増やした (ミード (Meade) ら、Protein Engineering 1, 67-76 (1986))。ミスマッチする塩基 (下線を引いた) を含むオリゴヌクレオチド (配列ID NO: 7) :

3' CGTGTACAT GGATAGT TGT CCAGCAAGTC
GACCTATAA 5' を合成した。セイヤーズ (Sayers) およびエクシュタイン (Eckstein) のホスホロチオエートを用いる方法にしたがってcatDNAの突然変異誘発を行なった (1989、タンパク質の機能において：実用的な方法 (In Protein Function: A Practical Approach), p279-295、クライトン (Creighton) による編集、T. E. IRL出版、オックスフォード)。Asn-34をGlnおよびThr-36をValに変換した置換による突然変異を含むプラスミド (pTZ19U-CAT14) をDNAシークエンシングによって確認した。次に、pTZ19U-CAT14のBamHI断片上の突然変異させたcat遺伝子を、正しい方向で組換えベクターpV326およびpV329中にクローニングして、それぞれプラスミドpV328-1およびpV331-10を作成した。35KプロモーターおよびN末端の42アミノ酸をコードする配列を含むpD351の約270bpのBclIおよびBglII断片を、pTZ19U-CAT14からのBamHIの突然変異させたcat断片とともにpV321のTK遺伝子座へ挿入してプラスミドpV325-11を作成した。Nに結合した糖鎖の付加の可能性のある部位をこわした2つのアミノ酸の置換を除いては、プラスミドpV328-1、pV331-10およびpV325-11はそれぞれpV328、pV331およびpV325と同じである。突然変異させたcat構築物を系統リスター (Lister) のゲノムのTK遺伝子座へ相対的組換え

によって導入し、そして上に記述したように組換えウィルスV328-1、V331-10およびV325-11を単離した。

突然変異させたcat遺伝子を含むウィルスによって生産されるCAT活性の解析

チュニカマイシンの存在下又は非存在下で、突然変異させたおよび野生型のcat遺伝子の構築物を含む組換えウィルスをBHK細胞に感染させて、分泌されたおよび細胞内のCAT活性を18時間の保温後に分析した。結果を表3に示す：

表3

突然変異させたcat遺伝子を含むウィルスの解析

Virus	CAT 活性 アセチル化されたクロラムフェニコールのnmole / 6 × 10 ⁸ 細胞		CAT 活性 +チュニカマイシン	
	SP	CE	SP	CE
V328	78.300	10214.20	45.020	4323.700
V328-1	0.145	160.00	0.037	55.840
V331	57.700	57.30	230.490	713.900
V331-10	0.038	0.56	0.017	0.358
V325	35.130	40.10	650.630	838.440
V325-11	0.058	2.13	0.019	1.038

注：チュニカマイシンの存在下または非存在下で細胞に感染させて、細胞外の培地 (SP) および細胞内の抽出物 (CE) においてCAT活性を求めた。

V328-1、V331-10およびV325-11によって生産されるCAT活性の水増しはチュニカマイシンによって向上しないことを表3は示している。逆にチュニカマイシンの存在下ではおそらくこの薬剤の細胞への有毒な効果のためにこれらのウィルスがコードするCAT活性はやや減少したように見えた。この薬剤の非存在下で、ウィルスV331-10およびV325-11によって発現される突然変異させたCATタンパク質は、(V331およびV325によって生産される) 突然変異させていない対応物よりも、ポリアクリルアミドゲル電気泳動において速く移動した。これは糖鎖の付加が起きる部位を除去する特異的

な突然変異と矛盾しない。これらのアミノ酸の置換はV328-1、V331-10およびV325-11がコードするCATの全体的活性の大幅減少も引き起こしたことが注目される(表3)。ウィルスV328-1、V331-10およびV325-11が発現する突然変異させたCATタンパク質の量に突然変異させていない対応物が発現するものと類似していることを他の結果は示している。したがって、これらの突然変異は強念なことにCATタンパク質の酵素活性を減少させてしまうように見える(おそらく活性中心への効果のため)ものの、特異的な突然変異によって、分泌されるCATの糖鎖の付加を阻止できることを上の結果は強く示唆している。

要約すると、前駆体ポリペプチドのN末端の22および42アミノ酸はシグナル配列として機能することおよびそれらのアミノ酸が付着するタンパク質の分泌を効果的に指令することの両方が可能である。しかし上記N末端のアミノ酸はハイブリッドタンパク質を分泌のための経路を經由させるので、1つの問題は本来ならば糖鎖の付加が起こらないタンパク質ももし糖鎖の付加可能な部位を含むならば、⁵糖鎖を経過する可能性があることである。チュニカマイシンを用いて、または分泌すべきタンパク質をコードする遺伝子の部位特異的な突然変異の誘発により、糖鎖の付加の部位を除去することによってこの問題を回避する可能性があることをこの結果は示している。この配列表は特定の締約国(EP C 諸国、米国、日本)の要求もしくは希望を満たすために本PCT出願に加えられた。一般的情報の部分に米国のみは適用される。

配列リスト

(1) 一般的情報

- (i) 出願人 : ガフニイ、ダレイナ フランセス; バテル、アーウィンド
ヒラブハイ; ストウ、ニゲル デニス; スパーシャーレブ、
ジョンハーバート
- (ii) 発明の名称 : ワクチニアウィルスのポリペプチドのシグナル配列をコードするDNA
- (iii) 配列の数 : 7
- (iv) 連絡先 : ニクソン&バンダーハイ、14階、2200 クラレンドン道

- (iv) 特性 : ポリペプチドの細胞膜の通過を可能にするシグナル配列をコードするDNAおよび分泌されるポリペプチドのN-末端配列

(v) 配列 ID NO. 1 :

ATG	AAA	C44	TAT	ATC	GTC	CTG	GCA	TGC	ATG	30
Met	Lys	G12	Tyr	Ile	Val	Leu	Ala	Cys	Met	
		-15						-10		
TGC	CTG	GCG	GCA	GCT	GCT	ATG	CCT	GCC	AGT	60
Cys	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Met	Pro	Ala	Ser	
		-5						1		

(3) 配列 ID NO. 2 の情報

(i) 配列の特性 :

- (A) 長さ : 20アミノ酸
- (B) タイプ : アミノ酸配列
- (D) トポロジー : 線状

(ii) 起源 : ワクチニアウィルス、リスター系統

(iii) 実験源 : ワクチニアウィルス、リスター系統

(iv) 特性 : ポリペプチドの細胞膜の通過を可能ならしめるシグナル配列および分泌されるポリペプチドのN-末端アミノ酸

(v) 配列 ID NO. 2 :

Met	Lys	Gln	Tyr	Ile	Val	Leu	Ala	Cys	Met	
		-15						-10		
Cys	Leu	Ala	Ala	Ala	Ala	Met	Pro	Ala	Ser	
		-5						1		

(4) 配列 ID NO. 3 の情報

(i) 配列の特性 :

- (A) 配列の長さ : 14アミノ酸
- (B) 配列のタイプ : アミノ酸配列

9. アーリントン、バージニア、米国22201

(v) コンピュータ検索可能型 :

- (A) 媒体 : ディスク、5.25インチ、360k^b 容量
- (B) コンピュータ : IBM PC/AT互換
- (C) オペレーティングシステム : MS-DOS 3.2
- (D) ソフトウェア : ワードパーフェクト ASCII ファイルフォーマット

(vi) 本出願のデータ :

- (A) 出願番号 :
- (B) 出願日 :
- (C) 分類 :

(vii) 先の出願のデータ :

- (A) 出願番号 : PCT/GB 90/
- (B) 出願日 :
- (A) 出願番号 : GB 8915807.3
- (B) 出願日 : 1989年7月11日

(viii) 代理人の情報 : レオナルド C. ミチャード 登録番号29009 参照書類No.

(ix) 電信の情報 :

- (A) 電話 : (703) 875-0400
- (B) ファックス : (703) 525-3468

(2) 配列 ID NO. 1 の情報

(i) 配列の特性 :

- (A) 長さ : 20アミノ酸に対応する60塩基対
- (B) タイプ : スクレオチドと対応アミノ酸
- (C) ストランド : 二本鎖
- (D) トポロジー : 線状

(ii) 起源 : ワクチニアウィルス、リスター系統

(iii) 実験源 : ワクチニアウィルス、リスター系統

(D) トポロジー : 線状

(ii) 起源 : ワクチニアウィルスの35K遺伝子、リスター系統

(iii) 実験源 : ワクチニアウィルスの35K遺伝子、リスター系統

(iv) フラグメント : ワクチニアウィルス、リスター系統の35KD蛋白質のN末端のアミノ酸残基4-17

(v) 配列 ID NO. 3 :

Leu	Gln	Gln	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	
		5						10		
Cys	Thr	Glu	Glu							
		15								

(5) 配列 ID NO. 4 の情報

(i) 配列の特性 :

- (A) 配列の長さ : 2577塩基対
- (B) 配列のタイプ : 塩基配列および対応する蛋白配列
- (C) ストランド : 二本鎖
- (D) トポロジー : 線状
- (E) 分子タイプ : ゲノムDNA

(ii) 起源 : ワクチニアウィルス、リスター系統

(iii) 実験源 : ワクチニアウィルス、リスター系統

(iv) 特性 : ワクチニアウィルスDNA、リスター系統の逆位末端繰り返しのフラグメント、35K遺伝子を含む(ゲノム当り2コピー)

(v) 性質 : 1544から2317番が35Kポリペプチドをコードする

(vi) 配列 ID NO : 4

GGATCGGACC CTAATTGGCC CGACGAGGAT GAACCTCACTT CTCTTCATTA CTACTGTAAA 60
 CACATATCCA CGTTCTACCA AAGCAATTAT TACAAGTCAA GTACACATAA GATGCGAGCC 120
 GAGAGCGGAT TCATCTACCC GATAATAGAT CATGGAGCAA ACATTAAACC GGTACACAC 180
 TTACCTTCAC CAGTATACCA AACATAGTCC TCGTGTGGTG TATGCTCTTT TATCTCGAGG 240
 ATACGTAATA ATCTTGATTG TACACATCA TGAACCGATT GTGCAACAGG TCATATTCTC 300
 ATAATGTTAC TCAATTGGCA CGAACAAAAG GAGGAGGAC AACATCTACT TTATCTATTC 360
 ATAAAACATA ATCAAGGATA CACTCTCAAT ATACTACGGT ATCTACTAGA TAGGTTCCAG 420
 ATTGAGAAAG AGCAATACTA TAATACGGCC TTTCAAAATT GTAAACAACA TGTTCGCTCA 480
 TACATCGGAT AGGACATCAA CTTTCCGACT AAAGACGGTA TTGCACTTGG TGTTCGAAAA 540
 CAGAAACATC ATATACAAGG CGGATGTTGT GAATGACATC ATCCACCACA GACTGAAAGT 600
 ATCTCTACCT ATGATTAAAT CGTGTCTCTA CAAGATGTCT CTCCCTACCA CGATTACTAC 660
 GTAAAAAAGA TACTAGCCTA CTGCTATTA AGGACGAGT CATTCGCGGA ACTACATAGT 720
 AAATTCTGTT TAAACGAGGA CTATAAAAGT GTATTTATGA AAAATATATC ATTGATAGAG 780
 ATAGATTECA TCATCGTGAC ATAAGTCGCC TTAAGAGAGT TCGAATCTCC GACACCGACC 840
 TGTATACGGT ATCAGAGETA TCTTAAAGCC ATACATTGAG ACAGACACAT TTCATTTECC 900
 ATGTACGAGC ATCTCAAGCC CGTACCAGCA AATACCTTTA ACTATATCGA TGTGGAATTT 960
 AATCTGTATC CGGTCAACGA CACATCGTGT ACTCGGAGCA CCACTACCGG TCTCAGCGAA 1020
 TCCATCTCAA CGTCGGAATC AACTATTACT ATGAATCATA AAGACTGTAA TCCCGTCTTT 1080
 CGTGATGGAT ACTTCTCTGT CCTTAATAAG GTAGCAACTT CAGGTTTCTT TACAGGAGAA 1140
 AGGTGTGCAC TCTGAATTC GAGATTAAAT GCAATAACAA AGATTCTTCC TCCAAACAGT 1200
 TACGAAAGG AAAGAATGAT ACTATCATGC CGCATTCGGA GACAGTAACT CTAGTGGCGG 1260
 ACATCTATAT ACTATATAGT AATACCAATA CTCAGACTA CGAACTGAT ACAATCTCTT 1320
 ATCATGTGGG TAATGTTCTC GATGTCGATA GCCATATGCC CGGTAGTTGC GATATACATA 1380
 AACTGATCAC TAATTCGAAA CCCACCCACT TTTTATAGTA AGTTTTTCAC CCATAAATAA 1440
 TAAATACAAT AATTAATTTT TCGTAAAGT AGAAAAATA TTCTAATTTA TTGCAACGTA 1500
 AGGAAGTAGA ATCATAAGA ACAGTACTCA ATCAATAGCA ATT ATG AAA CAA TAT -1555
 Met Lys Gln Tyr -15

GTT CGT ATC GGA GAC ATG TGC AAG GAA TCA TCT GAA CTT GAG GTC AAG 2227
 Val Arg Ile Gly Asp Met Cys Lys Glu Ser Ser Glu Leu Glu Val Lys 200 205 210
 GAT GGA TTC AAG TAT GTC GAC GGA TCG GCA TCT GAA GGT GCA ACC GAT 2275
 Asp Gly Phe Lys Tyr Val Asp Gly Ser Ala Ser Glu Gly Ala Thr Asp 215 220 225
 GAT ACT TCA CTC ATC GAT TCA ACA AAA CTC AAA GCG TGT GTC TGA 2320
 Asp Thr Ser Leu Ile Asp Ser Thr Lys Leu Lys Ala Cys Val --- 230 235 240
 ATCGATAACT CTATTCATCT GAAATGGAT GAGTAGGGTT AATCGAACGA TTCAGGCA 2380
 CCACGAATTA AAAAGTGTA CCGGACACTA TATTCGGTT TGCAAAACAA AAATGTTCTT 2440
 AACTACATTC ACAAAAGTT ACCTCTCGCG ACTTCTCTTT TTCTGTCTC AATAGTGTGA 2500
 TACGATTATG ACACATATCC TATTECTATT CCTATTTCCT TTCAGGSTAT CACAAAAATA 2560
 TTAACCTCTT TTCTGAT 2577

ATC GTC CTG GCA TGC ATG TGC CTG GCG GCA GCT GCT ATG CCG GCC AGT 1603
 Ile Val Leu Ala Cys Met Cys Leu Ala Ala Ala Met Pro Ala Ser -10 -5 1
 CTT CAG CAA TCA TCC TCA TCC TCC TCC TCG TGT ACC GAA GAA GAA AAC 1651
 Leu Gln Gln Ser Ser Ser Ser Ser Ser Ser Cys Thr Thr Glu Glu Asn 5 10 15
 AAA CAT CAT ATG GGA ATC GAT GTT ATT ATC AAA GTC ACA AAG CAA GAC 1699
 Lys His His Met Gly Ile Asp Val Ile Ile Lys Val Thr Lys Glu Asp 20 25 30 35
 CAA ACA CCG ACC AAT GAT AAG ATT TGC CAA TCC GTA ACG GAA ATT ACA 1747
 Gln Thr Pro Thr Asn Asp Lys Ile Cys Gln Ser Val Thr Glu Ile Thr 40 45 50
 GAG TCC GAG TCA GAT CCA GAT CCC GAG GTG GAA TCA GAA GAT GAT TCC 1795
 Glu Ser Glu Ser Asp Pro Asp Pro Glu Val Glu Ser Glu Asp Asp Ser 55 60 65
 ACA TCA GTC GAG GAT GTA GAT CCT CCT ACC ACT TAT TAC TCC ATC ATC 1843
 Thr Ser Val Glu Asp Val Asp Pro Pro Thr Thr Tyr Ser Ile Ile 70 75 80
 GGT GGA GGT CTG AGA ATG AAC TTT GGA TTC ACC AAA TGT CCT CAG ATT 1891
 Gly Gly Gly Leu Arg Met Asn Phe Gly Phe Thr Lys Cys Pro Gln Ile 85 90 95
 AAA TCC ATC TCA GAA TCC GCT GAT GGA AAC ACA GTG AAT GCT AGA TTG 1939
 Lys Ser Ile Ser Glu Ser Ala Asp Gly Asn Thr Val Asn Ala Arg Leu 100 105 110 115
 TCC AGC GTG TCC CCA GGA CAA GGT AAG GAC TCT CCC GCG ATC ACT CGT 1987
 Ser Ser Val Ser Pro Gly Gln Gly Lys Asp Ser Pro Ala Ile Thr Arg 120 125 130
 GAA GAA GCT CTT GCT ATG ATC AAA GAC TGT GAG GTG TCT ATC GAC ATC 2035
 Glu Glu Ala Leu Ala Met Ile Lys Asp Cys Glu Val Ser Ile Asp Ile 135 140 145
 AGA TGT ACC GAA GAA GAG AAA GAC ACC GAC ATC AAG ACC CAT CCA GTA 2083
 Arg Cys Ser Ser Glu Glu Glu Lys Asp Ser Asp Ile Lys Thr His Pro Val 150 155 160
 CTC GGG TCT AAC ATC TCT CAT AAG AAA GTG AGT TAC GAA GAT ATC ATC 2131
 Leu Gly Ser Asn Ile Ser His Lys Lys Val Ser Tyr Glu Asp Ile Ile 165 170 175
 GGT TCA ACG ATC GTC GAT ACA AAA TGT GTC AAG AAT CTA GAG TTT ACC 2179
 Gly Ser Thr Ile Val Asp Thr Lys Cys Val Lys Asn Leu Glu Phe Ser 180 185 190 195

(6) 配列 I D NO. 5 の情報

(i) 配列の特性 :

(A) 配列の長さ : 6 アミノ酸

(B) 配列のタイプ : アミノ酸配列

(D) トポロジー : 線状

(ii) 起源 : ワクチニアウィルス、リスター系統の 3.5 K ポリペプチド

(iii) 実験源 : ワクチニアウィルス、リスター系統の 3.5 K ポリペプチド

(iv) フラグメント : ワクチニアウィルス、リスター系統の 3.5 KD 蛋白質の N 末端のアミノ酸残基 1-6

(v) 配列 I D NO. 5 :

Pro Ala Ser Leu Gln Gln
 1 6

(7) 配列 I D NO. 6 の情報

(i) 配列の特性 :

(A) 配列の長さ : 2.6 塩基対

(B) 配列のタイプ : スクレオチド配列

(C) ストランド : 二本鎖

(D) トポロジー : 線状

(ii) 特性 : オリゴスクレオチド

(iii) 配列 I D NO. 6 :

ACTCAATCAA TAGCAATTAT GGATCC 26

(8) 配列 I D NO. 7 の情報

(i) 配列の特性 :

(A) 配列の長さ : 3.9 塩基

(B) 配列のタイプ : 核酸

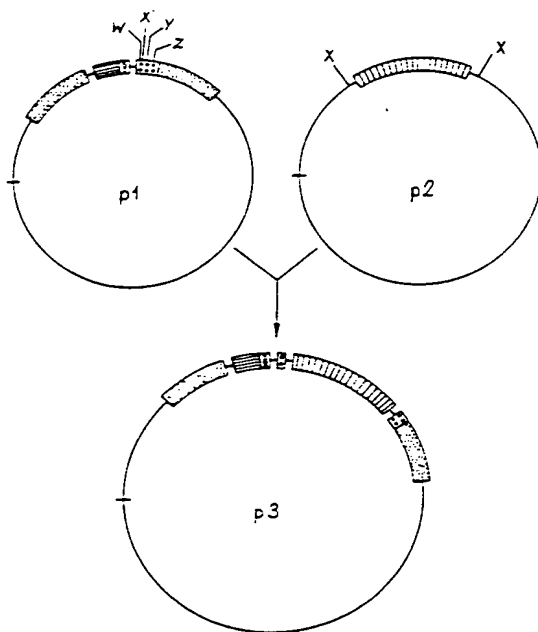
(C) ストランド : 一本鎖

(D) トポロジー : 線状

(ii) 特 性 : オリゴヌクレオチド

(圖) 配列 I D NO. 7 :

AATATCCAGC TGAACGACCT GTTGATAGGT ACATTGTCC 39









-  シガナル配列
-  外挿遺伝子
-  プロモーター
-  不可欠ではない割合
-  マルチコロニアル遺伝
-  プラスミド DNA

Fig. 2

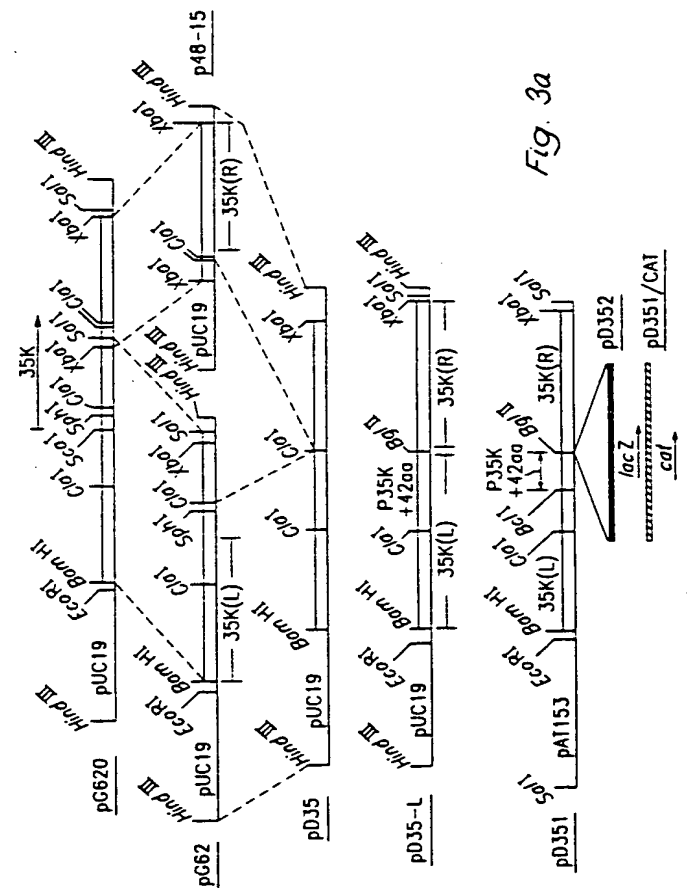
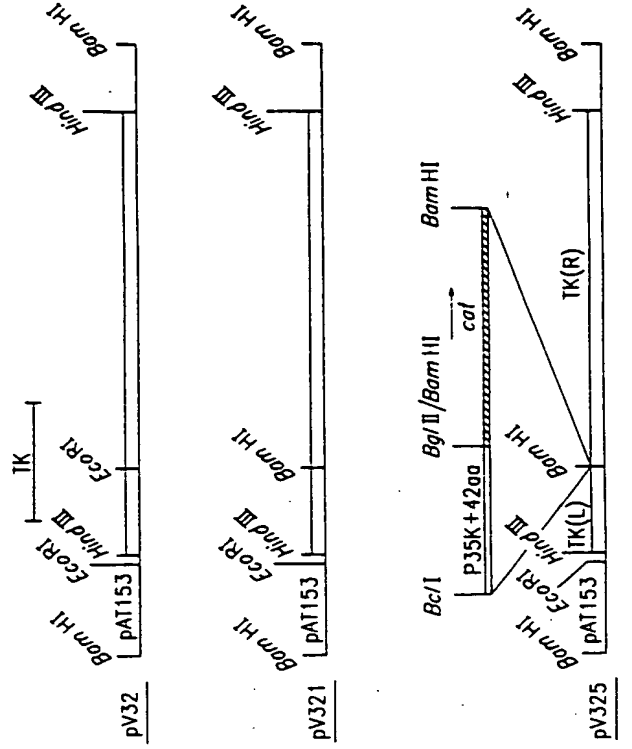
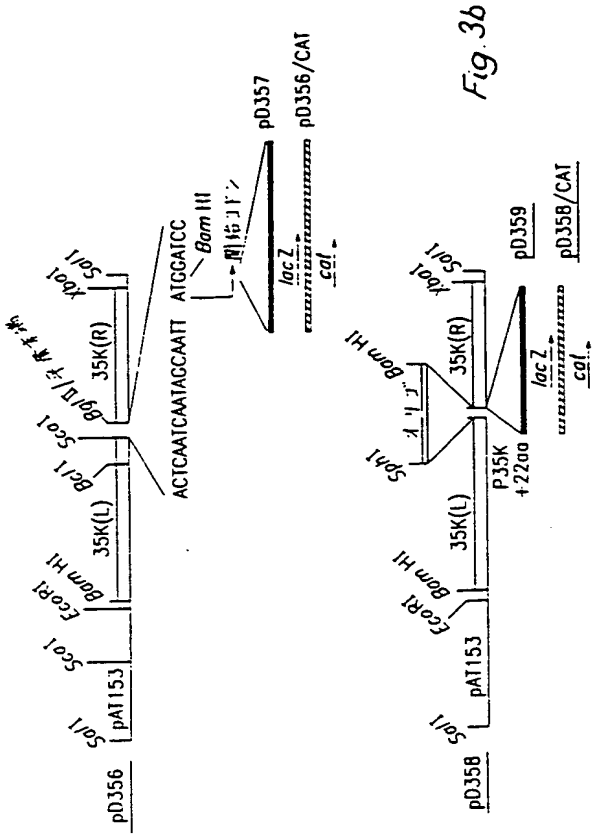
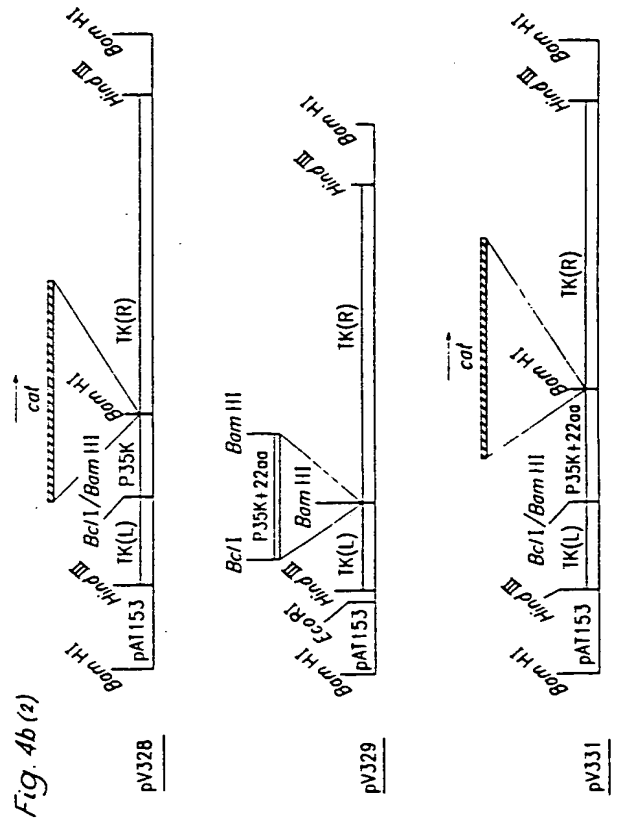
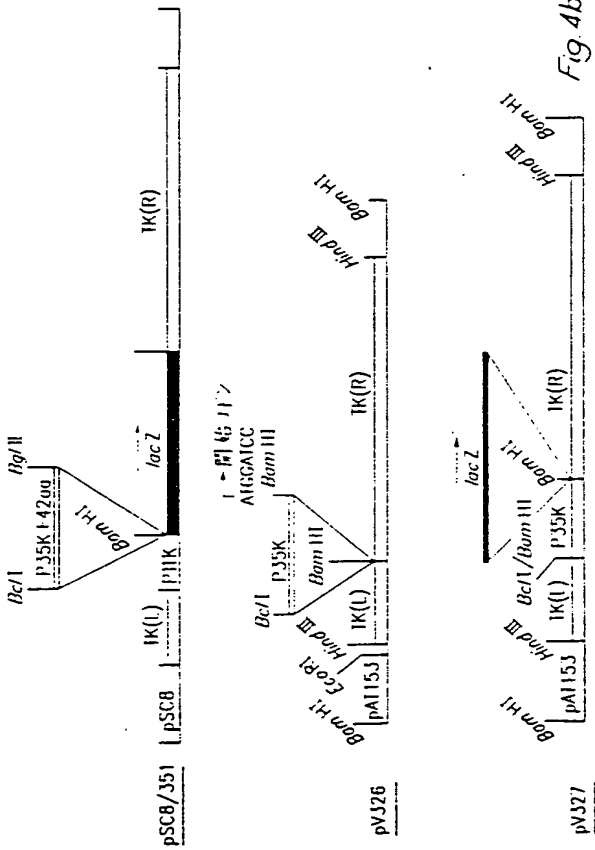


Fig. 3a



For more details about this survey, see *Medical Journal of the Australian People* (1997), 4, 120.